

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 547 926**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **83 10595**

⑤① Int Cl³ : G 01 N 33/74.

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②② Date de dépôt : 27 juin 1983.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOP « Brevets » n° 52 du 28 décembre 1984.

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦① Demandeur(s) : *Société anonyme dite : BIOMERIEUX et
Etablissement public dit : INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE. — FR.*

⑦② Inventeur(s) : J. C. Nicolas, A. M. Boussioux, A. M.
Boularan, B. Terouanne, B. Descomps, A. Crastres de
Paulet et G. Trouyez.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : Beau de Loménie.

⑤④ Procédé de dosage des œstrogènes et des androgènes par amplification et bioluminescence.

⑤⑦ Procédé de dosage des œstrogènes (œstradiol et œs-
trone) et des androgènes (après leur conversion en androgènes
par action d'une enzyme « aromatasase ») qui consiste à combi-
ner le procédé d'amplification enzymatique utilisant une réac-
tion de transhydrogénation conduisant à l'accumulation de
NADH et le dosage du NADH formé par bioluminescence en
utilisant une oxydoréductase et une luciférase extraite et Bene-
ckea Haiveyi.

FR 2 547 926 - A1

Le procédé de dosage des oestrogènes et des androgènes selon l'invention est une combinaison du procédé d'amplification enzymatique faisant appel à une transhydrogénase spécifique (la 17 β - hydroxystéroïde déshydrogénase) d'une part, et, d'autre part, du procédé de dosage du NADH formé par bioluminescence mettant en jeu une chaîne d'oxydoréduction du NADH et la luciférase extraite de *Beneckae harveyi*.

La combinaison selon l'invention permet d'assurer la spécificité du système, évitant l'emploi d'un dosage en phase hétérogène et donnant une grande sensibilité qui permet d'opérer avec un temps d'incubation relativement court.

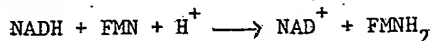
Le dosage des oestrogènes (oestrone et oestradiol) utilise la réaction de transhydrogénation catalysée par la 17 β - oestradiol-déshydrogénase du placenta humain qui, en présence d'oestradiol et d'oestrone, transfère l'hydrogène du NADPH au NAD, conduisant à une accumulation de NADH proportionnelle à la concentration en oestrogènes (oestrone + oestradiol).

Le système de transfert de l'hydrogène est réalisé par l'interconversion de l'oestrone en oestradiol, cette réaction se faisant en moins d'une seconde, et, le substrat étant constamment recyclé, la réaction peut être réalisée pendant un temps d'incubation de quelques minutes à plusieurs heures, entraînant ainsi un facteur d'amplification compris entre 1000 et 100 000 selon le temps d'incubation.

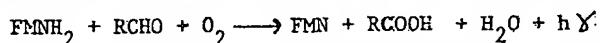
Le procédé précédemment décrit (références (1) et (2) ci-dessus) met en oeuvre comme méthode de dosage du NADH une méthode pratique mais peu sensible, utilisant l'absorbance de ce coenzyme à 340 nm, et nécessite un facteur d'amplification relativement élevé, donc un temps d'incubation de plusieurs heures.

L'utilisation d'enzymes bioluminescentes permet de doser des quantités de NADH de l'ordre de la picomole et donc, associée au système de transhydrogénase, de réduire considérablement le temps d'amplification et d'augmenter la sensibilité du dosage.

Le réactif de dosage de NADH par bioluminescence comprend une NADH - FMN oxydoréductase (FMN = flavine mononucléotide) qui catalyse la réaction :



5 et une luciférase qui utilise le FMNH₂ produit, en présence d'une aldéhyde à longue chaîne (RCHO) et d'oxygène, pour produire de la lumière selon la réaction suivante, couplée avec la précédente :



10 On mesure au photomètre l'intensité de lumière produite, qui est proportionnelle à la concentration de NADH.

I - Dosage des oestrogènes (oestrone + oestradiol) dans le plasma ou l'urine:

Le procédé selon l'invention utilise, d'une part, un tampon transhydrogénase contenant les constituants suivants :

- 15 - glucose-6-phosphate = 10^{-2} à 10^{-5} mol./l, de préférence 10^{-3} mol./l
 - glucose-6-phosphate déshydrogénase = 10 à 1 000 unités/l et de préférence 100 unités/l
 - NAD = 10^{-2} à 10^{-5} mol./l, de préférence $2 \cdot 10^{-4}$ mol./l
 - NADP = 10^{-5} à 10^{-10} mol./l, de préférence $2 \cdot 10^{-7}$ mol./l ;
 20 d'autre part un réactif de bioluminescence contenant :
 - FMN = 0,5 à 10 mg/l, de préférence 5 mg/l
 - aldéhyde aliphatique = 0,2 à 20 µg/l, de préférence 10 µg/l de dècanal
 - NADH/FMN oxydoréductase = 2 à 50 U.I./l et, de préférence 20 U.I./l
 - luciférase extraite de *Beneckea harveyi* = 1 à 30 mg/l, de préférence
 25 20 mg/l

Le protocole de dosage est le suivant :

On utilise 3 tubes (désignés 1, 2 et 3) contenant chacun :

- 30 - 10 à 1 000 µl, de préférence 200 µl de tampon transhydrogénase
 - et l'échantillon à doser : soit 1 à 5 µl d'urine ou
 10 à 30 µl de plasma.

Les tubes 2 et 3 reçoivent 10 à 500 µl, et de préférence 100 µl, (soit environ 10 milliunités/l) de 17 β - hydroxystéroïde déshydrogénase.

Le tube 3 reçoit une surcharge connue, de 5 à 50 pg (de préférence
 35 10 pg) d'oestradiol.

Les 3 tubes sont incubés de 10 min. à 2 heures, chacun selon la sensibilité requise (de préférence 15 à 30 minutes).

Puis, on ajoute séquentiellement à chaque tube le réactif de bioluminescence et on mesure la luminescence (variation de l'intensité de la lumière) sur 30 secondes ou 1 minute.

Le calcul de la quantité d'oestrone + oestradiol présente dans l'échantillon est réalisé en comparant les résultats obtenus pour l'échantillon (tube 2 - tube 1) aux résultats obtenus pour la surcharge (tube 3 - tube 2) de concentration connue.

Il faut noter qu'il est nécessaire, immédiatement avant de mesurer la luminescence du tube témoin (1) d'injecter 100 µl de 17 β - hydroxystéroïde déshydrogénase, puis le réactif de bioluminescence.

Du fait de la grande sensibilité de la méthode (de l'ordre de la femtomole) l'utilisation d'anticorps anti-stéroïde peut être envisagée pour augmenter la spécificité de la méthode de dosage et ainsi peut être appliquée au dosage spécifique de l'oestrone, de l'oestradiol et des différents androgènes.

II - Dosage spécifique de l'oestradiol dans le serum ou dans l'urine.

Le principe du dosage repose sur l'absorption spécifique du stéroïde à doser par un anticorps spécifique. Dans le cas de l'oestradiol :

- le dosage est réalisé sur trois tubes :

le témoin contient l'échantillon à doser (oestradiol + oestrone) préalablement traité pendant 30 mn, par un immunoabsorbant spécifique du stéroïde à doser. Les tubes 2 et 3 contiennent l'échantillon normal et le troisième tube une surcharge connue en stéroïde à doser.

Le dosage spécifique de l'oestrone ou de l'oestradiol peut ainsi être réalisé directement par addition du réactif complet de transhydrogénase, incubation 15 à 30 minutes et dosage du NADH par bioluminescence (selon le § I.).

Une autre voie plus simple pour doser spécifiquement l'oestradiol consiste à faire réagir l'oestrone avec un réactif des cétones tel que l'hydrazine. Le procédé est le suivant :

- le tube "oestradiol + oestrone" contient de 100 à 1 000 µl, de préférence 500 µl, de serum ou d'urine et 100 à 500 µl, de préférence 120 µl, d'eau distillée. Le tube "oestradiol" contient

les mêmes quantités de sérum ou d'urine, mais l'eau distillée est remplacée par un volume égal de chlorhydrate d'hydrazine 6mol/l. pH 7,4.

Après réaction, le contenu de chaque tube est extrait par 1 à 5 µl d'éther qui est lavé par un égal volume de tris HCl 0,1 mol/l. La phase étherée séparée est évaporée, le résidu repris par 250 µl de tampon transhydrogénase est dosé selon le protocole décrit au § I.

III - Dosage des androgènes.

Le dosage des androgènes nécessite l'utilisation d'une enzyme capable de convertir les androgènes en oestrogènes, enzyme
10 membranaire contenue dans le placenta. Cette enzyme doit être débarrassée de son contenu en stéroïde. La purification est conduite selon le procédé ci-dessous. La préparation contient les activités suivantes : une sulfatase, une 3 β - hydroxystéroïde - déshydrogénase, une Δ5, Δ4 - cétostéroïde - isomérase et une aromatisation. Elle est désignée
15 ci-après par le terme "aromatase".

1. Procédé de préparation de l'aromatase

1/1. Préparation des microsomes :

Les cotylédons de 2 placentas sont homogénéisés dans 1 litre de tampon phosphate 30mmol/l, pH 7,2, 20 % de glycérol. L'homogénat est centrifugé à 10 000 g pendant 30 mn. Le surnageant est centrifugé à nouveau 60 mn à 105 000 g. Le culot correspondant à la fraction
20 microsomiale est lavé 2 fois par 500ml de tampon. Le lavage a lieu par homogénéisation puis centrifugation.

1/2. Solubilisation des microsomes :

La solubilisation des microsomes doit être effectuée rapidement afin d'éviter toute perte d'activité enzymatique durant cette étape. Le culot de microsomes précédemment obtenu est remis en suspension dans 50 ml de tampon phosphate (30 mmol/l, pH 7,2, 25 % de glycérol), puis on ajoute 50 ml de ce même tampon contenant 8 % de
30 Triton X100. La suspension est homogénéisée à 4°C dans un Potter (verre téflon) pendant 30 mn. La suspension est ensuite centrifugée 60 mn à 105 000 g.

Le Triton X100 est éliminé de ce surnageant par chromatographie sur résine hydrophobe de type XAD2(R). La solution est passée
35 sur une colonne (φ 2,5 cm x 15 cm) de résine équilibrée contre le tampon phosphate. La solution d'aromatase est éluée grâce à ce même tampon et les fractions colorées sont rassemblées.

1/3. Mesure de l'activité aromatase :

La mesure est réalisée dans 350 μ l de tampon 200 mmol/l Tris HCl, pH 8 contenant 10^{-5} mol NADP, 10^{-4} mol glucose-6-phosphate, 10^{-3} mol dithiothreitol, 0,1 unité glucose-6-phosphate déshydrogénase et 10^{-5} mol de substrat stéroïde (androstènedione ou testostérone ou déhydroépiandrostérone). La solution d'aromatase est ajoutée et l'incubation poursuivie pendant 15, 30 et 60 mn. Les oestrogènes formés sont dosés selon le procédé usuel sur 100 μ l du milieu.

2. Dosage du sulfate de déhydroépiandrostérone plasmatique (SDHEA)

Le dosage est réalisé sur une quantité de 0,5 à 1 μ l de sérum. Le tampon de transformation de la déhydroépiandrostérone (DHEA) en oestradiol est le même que celui décrit précédemment pour la mesure de l'activité aromatase, c'est-à-dire, un tampon 200 mmol/l Tris-HCl, pH 8. A 60 μ l de tampon contenant l'aromatase, on ajoute 40 μ l d'eau pour constituer le tube (1) correspondant au témoin aromatase. Comme la quantité de sérum utilisée est très faible, le dosage ne nécessite pas de tube correspondant au témoin sérum. Les densités optiques du tube (2) dosage - sérum (auquel on ajoute 20 μ l d'une dilution de sérum + 20 μ l d'eau) et du tube (3) dosage + surcharge (auquel on ajoute 20 μ l d'une dilution de sérum + 20 μ l de tampon contenant 2 pmoles de SDHEA) sont lues, en fin de dosage, contre le témoin aromatase (1).

La quantité d'aromatase ajoutée sous un volume en général de 10 μ l doit être suffisante pour assurer une conversion totale de 10 ng de DHEA. Le temps d'incubation est compris entre 30 mn et 2 heures.

Après aromatisation, de 0,2 à 1 ml, de préférence 0,2 ml, de tampon transhydrogénase sont ajoutés, l'incubation est poursuivie 10 à 30 mn, de préférence 10 mn, les tubes sont mesurés séquentiellement après addition de 100 μ l de réactif de bioluminescence, de la même façon que décrit ci-dessus pour le dosage des oestrogènes.

3. Dosage de l'ensemble DHEA, Δ^4 - androstènedione, testostérone :

Afin d'éliminer du sérum le sulfate de DHEA, il est nécessaire de procéder à une extraction par l'éther, le sulfate de DHEA n'étant pas extractible : 0,5 ml de sérum sont extraits par 4 ml d'éther. La phase étherée, après lavage est évaporée et le résidu repris par

0,5 ml de tampon tris 0,1 mol/l, pH 7,2. 20 μ l de cet extrait (échantillon) sont traités par 50 μ l de tampon contenant l'aromatase selon le procédé suivant :

- 5 - le tube témoin (1) contient l'aromatase inactivée ainsi que l'échantillon,
- le tube dosage (2) contient l'aromatase non-inactivée ainsi que l'échantillon,
- le tube surcharge (3) contient l'aromatase non-inactivée, l'échantillon et la surcharge.

10 Après incubation 30 minutes à 37°C, l'aromatase est inactivée par chauffage ou par traitement alcalin suivi de neutralisation. On ajoute alors 200 μ l de tampon transhydrogénase. Une incubation de 15 mn à 2 heures à 20-25°C, selon la sensibilité désirée, est suivie d'addition de 100 μ l de réactif de bioluminescence ; la
15 mesure de la luminescence est faite comme précédemment.

4. Dosage de testostérone + androsténédione :

 Le dosage plasmatique nécessite l'extraction par éther de 1 ml de plasma ou l'utilisation d'une technique similaire d'extraction (colonne d'extrémité). Le dosage peut être réalisé sur l'équivalent
20 de 200 μ l de plasma selon le procédé précédent. Il faut toutefois utiliser, comme système d'aromatation, une préparation dont l'activité 3 β - hydroxystéroïde déshydrogénase d'enzymes est inhibée par le 11 α -bromoacétate de progestérone (afin de ne pas transformer la DHEA).

 L'inhibition est réalisée à 25°C, à pH 7,9 par 10⁻⁴ mol/l
25 de 11 α -bromoacétoxyprogestérone (ce dérivé a été synthétisé par estérification de la 11 α -hydroxyprogestérone par le bromoacétate).

 La surcharge en sulfate de DHEA est remplacée par une surcharge en testostérone. La concentration en enzymes doit être égale ou inférieure à 100 μ g/ml.

30 L'inhibition est quasi complète après 2 heures d'incubation. L'excès de stéroïdes est enlevé par une chromatographie sur résine hydrophobe selon le procédé précédent. L'activité aromatase résiduelle mesurée avec la déhydroépiandrostérone doit être inférieure à 5 % de celle mesurée avec la testostérone.

5. Dosage de la testostérone utilisant les anticorps antitestostérone :

Le dosage fait appel à trois tubes, chacun contenant 50 μ l d'extrait sérique correspondant à 5 μ l de sérum.

5 Le tube (1) correspond au témoin sérum et sera traité pendant 15 mn à 25°C par 50 μ l d'anticorps antitestostérone.

Le tube (2) recevra 50 μ l de tris.

Le tube (3) 50 μ l de tris contenant 12 pg de testostérone.

10 Après addition de 50 μ l de tampon aromatase et 30 mn d'incubation à 37°C, on inactive l'aromatase;

Puis on additionne 300 μ l de tampon transhydrogénase et incube 1 heure à 37°C. Après addition de 100 μ l de réactif de bioluminescence les tubes sont lus séquentiellement.

15 Les avantages du procédé de dosage selon l'invention sont les suivants :

Cette méthode, en utilisant à la fois l'amplification enzymatique et la bioluminescence, permet de réaliser des dosages spécifiques des oestrogènes et des androgènes avec une sensibilité supérieure aux méthodes radioimmunologiques (gain en sensibilité 10) et ne nécessite qu'un temps d'incubation relativement court.

20 De plus, cette méthode peut être automatisée facilement avec une instrumentation déjà existante.

Au niveau de la spécificité, elle permet de cumuler à la fois la spécificité de l'enzyme et celle de l'anticorps. L'utilisation d'un standard interne évite les utilisations d'une courbe étalon et met en évidence les interférences dues aux milieux.

25

R E V E N D I C A T I O N S

1. Procédé de dosage des oestrogènes et des androgènes présents dans les milieux biologiques, caractérisé en ce qu'il combine le procédé d'amplification enzymatique utilisant une réaction de transhydrogénation conduisant à l'accumulation de NADH, et le dosage du NADH formé par bioluminescence.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on associe la 17 β - hydroxystéroïde déshydrogénase de placenta humain pour la réaction de transhydrogénation, à une NADH-FMN oxydoréductase et une luciférase extraites de microorganismes pour le dosage par bioluminescence, en présence des coenzymes et aldéhyde nécessaires.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'on utilise un réactif de transhydrogénation ou "tampon transhydrogénase" constitué par :
 - 10^{-2} à 10^{-5} mol/l de glucose-6-phosphate
 - 10 à 1000 unités/l de glucose-6-phosphate déshydrogénase
 - 10^{-2} à 10^{-5} mol/l de NAD
 - 10^{-5} à 10^{-10} mol/l de NADP
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on utilise un réactif de bioluminescence constitué par :
 - 0,5 à 10 mg/l de FMN
 - 0,2 à 20 μ g/l d'une aldéhyde aliphatique telle que le décanal
 - 2 à 50 UI/l de NADH/FMN oxydoréductase
 - 1 à 30 mg/l de luciférase de Beneckea Harveyi
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on dose le couple oestradiol-oestrone dans le plasma sanguin ou l'urine en utilisant 3 tubes à essai contenant chacun l'échantillon à doser et le tampon - transhydrogénase ; le tube 1 est le tube témoin et les tubes 2 et 3 reçoivent chacun de la 17 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase ; le tube 3 reçoit, de plus, une surcharge connue d'oestradiol; après incubation des tubes de 10 mm à 2 heures, on ajoute à chaque tube le réactif de bioluminescence et mesure la luminescence sur 30 secondes ou 1 minute; on calcule la quantité d'oestradiol + oestrone dans l'échantillon en comparant les résultats obtenus pour l'échantillon (tube 2 - tube 1) aux résultats obtenus pour la surcharge (tube 3-tube 2)

de concentration connue.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on dose spécifiquement l'oestradiol ou l'oestrone dans le plasma ou l'urine en traitant d'abord l'échantillon par un immunoadsorbant spécifique du stéroïde à doser, puis en dosant le stéroïde par addition du réactif de transhydrogénase, incubation et dosage du NADH par bioluminescence.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on dose spécifiquement l'oestradiol dans le plasma ou l'urine en éliminant d'abord l'oestrone par réaction avec l'hydrazine.

8. Procédé de dosage des androgènes selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'on convertit d'abord les androgènes en oestrogènes par action d'une enzyme extraite du placenta et qui présente des activités de sulfatase, de 3 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase, de Δ^5, Δ^4 -cétostéroïde-isomérase et d'aromatase, et qu'on dose ensuite les oestrogènes, après avoir inactivé l'aromatase par chauffage ou traitement alcalin, par addition du réactif de transhydrogénase, incubation et dosage du NADH par bioluminescence.

9. Procédé de dosage du couple testostérone + androsténédione selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on utilise, pour la conversion des androgènes en oestrogènes, une préparation enzymatique dont l'activité 3 β - hydroxystéroïde - déshydrogénase est inhibée par le 11 α -bromacétate de progestérone.